

10/057791 file copy

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-5737

(43)公開日 平成5年(1993)1月14日

| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号   | F I           | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|----------|---------------|--------|
| G 0 1 N 33/53            | G    | 8310-2 J |               |        |
| C 0 7 K 17/02            |      | 7731-4 H |               |        |
| C 1 2 P 21/08            |      | 8214-4 B |               |        |
|                          |      | 7236-4 B | C 1 2 N 5/ 00 | B      |
|                          |      | 8828-4 B | 15/ 00        | C      |

審査請求 未請求 請求項の数7(全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-183294

(22)出願日 平成3年(1991)6月28日

(71)出願人 000186913

昭和シエル石油株式会社

東京都千代田区霞が関3丁目2番5号

(72)発明者 松本 孝夫

東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 昭和シエル石油株式会社内

(72)発明者 柴崎 久幸

東京都千代田区霞が関3丁目2番5号昭和シエル石油株式会社内

(74)代理人 弁理士 友松 英爾

(54)【発明の名称】 新規な酵素標識モノクローナル抗体、それを用いたメタンフェタミン測定用キットおよび測定法

(57)【要約】

【目的】メタンフェタミン測定用キット中にメタンフェタミンを使用しなくても、簡単かつ正確にメタンフェタミンを検知できるメタンフェタミン測定用キットの提供およびそのキットに使用する新規モノクローナル抗体の開発。

【構成】 (A)メタンフェタミンおよびN, N'-ジベンジルエチレンジアミンの両者に対して特異的な免疫反応を示すモノクローナル抗体を酵素標識して得られた酵素標識モノクローナル抗体と、(B)N, N'-ジベンジルエチレンジアミンと支持蛋白質との複合体を担持させた担体とを含有するメタンフェタミン測定用キット。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 メタンフェタミンおよびN, N'-ジベンジルエチレンジアミンの両者に対して特異的な免疫反応を示すモノクローナル抗体を酵素標識することにより得られた酵素標識モノクローナル抗体。

【請求項2】 (A) 請求項1記載の酵素標識モノクローナル抗体と、

(B) N, N'-ジベンジルエチレンジアミンと支持蛋白質との複合体を担持させた担体

とを含有することを特徴とするメタンフェタミン測定用キット。

【請求項3】 前記担体が、容器またはスティックである請求項2記載のメタンフェタミン測定用キット。

【請求項4】 前記容器が、吸引可能な容器である請求項3記載のメタンフェタミン測定用キット。

【請求項5】 (A) 請求項1記載の酵素標識モノクローナル抗体。

(B) N, N'-ジベンジルエチレンジアミンと支持蛋白質との複合体を担持させた担体

(C) 尿または唾液

(D) 基質溶液

とを混合反応後、生成したアンモニア成分を検知することを特徴とする尿または唾液中のメタンフェタミンの測定法。

【請求項6】 前記アンモニア成分の検知は系のpH変化によるものである請求項5記載の尿または唾液中のメタンフェタミンの測定法。

【請求項7】 N, N'-ジベンジルエチレンジアミンと支持蛋白質との複合体をその上に固定してなる担体。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】本発明は、メタンフェタミンとN, N'-ジベンジルエチレンジアミンの両者に対して、特異的に認識するモノクローナル抗体を酵素標識化したモノクローナル抗体、それを利用したメタンフェタミンの測定用キットおよび測定方法に関する。

【0002】

【従来技術】覚醒剤に関連する事件の増加に伴い、メタンフェタミン（以下MAと略称することがある）の使用者を簡便、迅速かつ正確に認知する必要性が高まり、簡便、高感度、高選択的にメタンフェタミンを測定する方法および測定用キットが望まれている。特開平1-96198号公報には、動物に免疫して得られた細胞株を培養することによって、覚醒剤であるメタンフェタミン（MA）に対して非常に高い特異的な反応性を示すモノクローナル抗体を得ることが提案されている。そして、現在、MAだけを特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた測定システムには、ELISA法を基本にした競合法によるものが商品化されている。しかし、この測定システム法では製品の中にMAそのものを使用する必

2

要があり、日本の覚醒剤取締り法により、これらの製品は製造、販売、使用が認められていないのが実情である。

【0003】

【目的】本発明の目的は、MAに対するモノクローナル抗体を誘導する時にMA以外に日本の法律に抵触しない特定物質を選択特異的に認識する新規酵素標識モノクローナル抗体の提供およびそれを用いたMA測定用キットと測定法を提供する点にある。

【0004】

【構成】本発明の第1は、メタンフェタミンおよびN, N'-ジベンジルエチレンジアミンの両者に対して特異的な免疫反応を示すモノクローナル抗体を酵素標識することにより得られた酵素標識モノクローナル抗体に関する。本発明の第2は、

(A) 請求項1記載の酵素標識モノクローナル抗体と、

(B) N, N'-ジベンジルエチレンジアミンと支持蛋白質との複合体を担持させた担体

とを含有することを特徴とするメタンフェタミン測定用キットに関する。前記担体は、容器、とくに吸引可能な構造の容器またはスティックであることが好ましいが、それ以外にも球体状、立方体状、針状など任意の形体のものが使用でき、材質としては格別の制限はないが、蛋白質が付着しやすい性質をもつものが適当で、合成樹脂（たとえば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメチルメタクリレート、ポリアミド、ポリエステルなど）、ゴム、ガラス、ニトロセルロースなどを挙げることができる。本発明の第3は

(A) 請求項1記載の酵素標識モノクローナル抗体、

(B) N, N'-ジベンジルエチレンジアミンと支持蛋白質との複合体を担持させた担体

(C) 尿または唾液

(D) 基質溶液

とを混合反応後、生成したアンモニア成分を検知することを特徴とする尿または唾液中のメタンフェタミンの測定法に関する。前記アンモニア成分の検知は系のpH変化による方法がもっとも簡便であり、適当なpH指示薬を使用することができる。本発明の第4は、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンと支持蛋白質との複合体をその上に固定した担体に関する。

【0005】〔モノクローナル抗体の製造プロセス〕

A. 免疫用抗原の調整

メタンフェタミン（MA）をアミノブチル化またはカルボキシメチル化してアミノブチル化またはカルボキシメチル化メタンフェタミンをつくり、これに任意の支持蛋白質を結合させて複合体を得、これを免疫用抗原とした。前記支持蛋白質としては、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、陣笠貝ヘモシアニン、サイログロブリン、 $\gamma$ -グロブリン等を挙げることができる。また、アミノブチル化もしくはカルボキシメチル化メタンフェタ

3

ミンと支持蛋白質を結合させる架橋剤としては、グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジメチルホルムアミド、マレイミドベンゾイルオキシサクシンイミド等が用いられる。

#### B. リンパ細胞の調整

前記免疫用抗原を哺乳動物（例えば、マウス、ラット等）に1週間おきに3〜5回投与し、抗原に対する抗体が充分生成しているのを確認後、その動物の血液リンパ節、脾臓等からリンパ細胞を得る。この時、免疫賦活剤としてアジュバンド（ミュウバン、結核死菌、核酸等を含む）を抗原物質と共にエマルジョンとして動物に投与することが好ましい。抗体の生成を確認する手段としては、免疫した動物から静脈血を採取し、後述する(II)-(3)のハイブリドーマの選択の項にあるELISA法を用いることにより判定する手段があげられる。

#### C. 細胞融合とハイブリドーマ株の選択

細胞融合に用いたミエローマ細胞としては、例えばマウス由来のP3-X63Ag8-U1 (P3-U1)、SP2/O-Ag14 (SP-2)、P3-NS1/1-Ag4.1 (NS-1)、P3-X63-Ag8.653 (653)、P3-X63-Ag8 (X63)、MPC-11、ラット由来の210、RCY3、AG1、2、3 (Y3)、ヒト由来のSKO-007、GH15006TG-A12などを挙げることができる。細胞融合は、前述したような免疫された動物のリンパ球とミエローマ細胞を約2〜10:1になるように混合し、これを遠心分離してリンパ球とミエローマ細胞の混合沈殿物を得、これにポリエチレングリコール (PEG) またはセンダイウィルス (HVJ) を含む細胞培養用培地 (RPMI 1640、MEM、DMEM等) を加え、懸濁することにより行うことができるが、操作上の点から、30%〜60%のPEG (分子量1000〜8000) を用いることが好ましい。ハイブリドーマ株の選択は、融合後の細胞懸濁液を遠心して上清を除き、これにヒボキサンチン、アミノプテリン、チミジン (HAT) と10%〜20%のウシ胎児血清 (FCS) を含む細胞培養用培地に再懸濁して、この懸濁液を培養用プレートに分注することにより行うことができる。この操作により選択されたハイブリドーマ細胞をさらにヒボキサンチン、アミノプテリン (HT) と10%〜20%のウシ胎児血清 (FCS) を含む細胞培養用培地で培養し、最終的には10%〜20%のウシ胎児血清 (FCS) を含む細胞培養用培地で培養する。この間、増殖したハイブリドーマ細胞は培地上清中に抗体を産生するため、ELISA (酵素免疫測定) 法、RIA (ラジオアイソトープ免疫測定) 法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いて目的の抗体の有無を調べることができるが、ELISA法を用いることが望ましい。このELISA法は以下のようにして行なうことができる。A. で調整した免疫用抗原

4

をELISAプレートの各ウェルに固定化して、次にブロッキング剤としてウシ血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン (OVA)、陣笠貝ヘモシアニン (KLH)、免疫グロブリン等の生体高分子蛋白質を各ウェルに固定化する。これは次の操作中、ハイブリドーマ細胞の産生した抗体がウェルに非特異的に吸着するのを防ぐためである。一定時間静置した後、上清液を捨て洗浄液 (リン酸緩衝液と生理食塩水溶液の混合液、界面活性剤を含む場合もある) で各ウェルを洗浄する。これに、ハイブリドーマ細胞培養上清液を添加し一定時間静置する。同様に洗浄液で各ウェルを洗浄し、次に酵素標識抗体、例えばマウスを用いた場合には抗マウスIgG抗体にアルカリフォスファターゼや西洋ワサビペルオキシダーゼ、βガラクトシダーゼ等の酵素が結合したものを各ウェルに添加し、一定時間静置する。洗浄液で各ウェルを洗浄し、次に、用いた酵素に各々対応した基質溶液を添加し反応させる。培養上清液中に目的とする抗体が存在していた場合、酵素反応により生じた基質の色の変化を、肉眼かもしくはプレートリーダーにより確認することができる。このようにして、抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を得ることができる。

#### D. ハイブリドーマ細胞のクローニング

C. で確認されたウェル中には、遺伝的に異なるハイブリドーマ細胞の混合物である可能性があるため、クローニング操作により単一な遺伝子からなるハイブリドーマ細胞群を得る必要がある。この方法には限界希釈法、シングルセルマニピュレーション法、軟寒天上のコロニーを一つずつ拾い上げる方法、FACS法 (Fluorescent Activated Cell Sorter) が挙げられるが、特別な装置を使わない点で、限界希釈法を用いることが望ましい。この限界希釈法は以下のようにして行なうことができる。上記ハイブリドーマ細胞を200個/ml、50個/ml、10個/mlとなるように0〜20%FCSを含む細胞培養用培地 (RPMI 1640、MEM、DMEM等) で調整し、各々の調整液を96ウェルプレート上の3、45、48ウェルに0.1mlずつ分注する。このプレートをCO<sub>2</sub>インキュベータ中で培養し、一つのコロニーが一つのハイブリドーマ細胞由来であることが確認されるようなウェルを選択する。これらのウェルの上清液中に存在するモノクローナル抗体がMAを認識するかどうかを、C. のELISA法により再検討する。このようにして、単一な遺伝子からなるハイブリドーマ細胞群が得られ、この細胞から産生された抗体はモノクローナル抗体であるといえる。

#### E. モノクローナル抗体の調整

MAに対するモノクローナル抗体の調整には、D. で得たハイブリドーマ細胞をフラスコ内、もしくは腹腔内で培養することにより行なうことができる。ハイブリドーマ細胞のフラスコ内での培養は、0〜20%のFCSを含む細胞培養用培地 (RPMI 1640、MEM、DM

5

EM等)を用いて行なう。この時、ハイブリドーマ細胞を最大限増殖させ、その後遠心分離を行えば、分泌されたモノクローナル抗体が上清中に得られる。ハイブリドーマ細胞の腹腔内での培養は、 $1 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞を、アリスタン等の鉱物油を投与した動物の腹腔内に注入する。この時利用する動物種は、ハイブリドーマ細胞の作成に用いたミエローマ細胞が増殖し易いように、由来となっているミエローマ細胞と同種、同系の動物を用いることが望ましい。例えばマウスを用いた場合、この操作により1~2週間後から腹腔内にハイブリドーマ細胞の増殖が認められ、それにともない腹腔内に腹水が蓄積する。目的のモノクローナル抗体は腹水中に存在しているため腹腔より腹水を回収し、さらに、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の操作によりモノクローナル抗体を分離精製することができる。

#### F. 酵素標識モノクローナル抗体の調整

精製したモノクローナル抗体と酵素とを緩衝溶液中で処理し、酵素標識モノクローナル抗体を得た。酵素としては、アルカリフォスファターゼ、西洋ワサビ、ヘルオキシダーゼ、ウレアーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グリコアミラーゼ、チロシナーゼなどが挙げられる。

#### G. 担体上へのDBED-支持蛋白質複合体の固定

##### (a) 吸着による結合方法

ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメチルメタクリレート、スチレン等の合成樹脂は、物理的に蛋白質を吸着するため、これらを材質とする担体の表面上に前記DBED-支持蛋白質複合体やモノクローナル抗体を効率よく結合させることができる。この時の担体は、一般に透明か、曇りガラス様であるが、青、黄、紫、赤等の着色を施してあるものもある。しかし、視認性に優れているという点で着色を施してある担体の方が望ましい。また、この反応は室温、1~10時間で終了するが、反応終了後グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジメチルホルムアミド、マレインイミド、ベンゾイルオキシサクシンイミド等の架橋剤を用いることにより、複合体あるいはモノクローナル抗体が担体から剥離しないように、また複合体あるいはモノクローナル抗体がより多く担体に吸着するように調整することもできる。

##### (b) 架橋による結合方法

担体の表面上にカルボキシル基、アミノ基が付与されているものを用いた場合、これらの官能基を利用して、前記DBED-支持蛋白質複合体やモノクローナル抗体を前記架橋剤を用いて共有結合させることができる。また担体と複合体あるいはモノクローナル抗体との間に、ジアミノブタン、ジアミノヘキサン、5-アミノカブロン

6

酸等のスペーサーを挿入することにより、担体と複合体あるいはモノクローナル抗体との距離を任意に変化させることもできる。

#### 【0006】

【実施例】以下に、本発明の実施例を具体的に説明する。尚、これらの実施例は本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

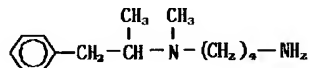
#### 実施例1

##### 1. 免疫用抗原の調整

##### 1. アミノブチル化メタンフェタミンの調整

メタンフェタミン(MA)を適当な蛋白質に結合させるために、例えばChengらの方法[FEBS LETTERS 36,339(1973)]に準じ、MAにアミノ基の導入を行なった。400mgのメタンフェタミン(MA)を40mlの脱水したエタノールに溶解し、2.272gのN-(4-ブロモブチル)フタルイミドと852mgの炭酸ナトリウムを添加して4日間還流した。次に0.5mlの85%含水ヒドラジンを加えて2日間攪拌した。反応液に1Nの塩酸を添加し酸性にした後、生じた沈殿物を濾過により除いた。濾液を50mlのクロロホルムを用いて3回抽出し、さらに水層を1Nの水酸化ナトリウムを用いてpHを10に調整後、50mlのクロロホルムを用いて4回抽出した。クロロホルム層をあわせ、硫酸マグネシウムで脱水し、クロロホルムを減圧留去した。このようにして、1.27gのN-(4-アミノブチル)メタンフェタミンを得た。

#### 【化1】

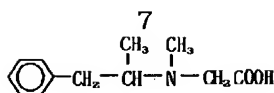


##### 2. カルボキシメチル化メタンフェタミンの調整

MAを適当な蛋白質に結合させるために、たとえばInayamaらの方法[Chem. Pharm. Bull 28,2779(1980)]に準じ、MAにカルボキシル基の導入を行なった。以下の反応は全て室温で行なった。600mgのメタンフェタミン、852mgの炭酸ナトリウム、1.5mlのエチルプロモ酢酸を40mlのエタノール中に溶解し、窒素ガス充填下で5日間還流した。反応終了後、濾過により沈殿物を除き、濾液を減圧濃縮した。次に、30mlの5%の水酸化カリウム-メタノール溶液を添加し、窒素ガス充填下で2日間攪拌した。反応終了後、反応液を2Nの塩酸で酸性にし、約1mlにまで減圧濃縮した。これに5mlの飽和塩化ナトリウム水溶液を添加し、25mlのクロロホルムで5回抽出した。このクロロホルム層を硫酸マグネシウムで脱水し、減圧濃縮した。このようにして691.1mgのN-カルボキシメチルメタンフェタミンを得た。

#### 【化2】

50



3. 免疫用抗原もしくは酵素免疫測定法(以下ELISAと略)に用いた抗原の調整は、上記のアミノブチル化、もしくはカルボキシメチル化メタンフェタミンを用いて行った。25mgのN-(4-アミノブチル)メタンフェタミンを1mlのPBS(10mM-リン酸緩衝液、150mM-塩化ナトリウム、pH7.2)に溶解後、1Nの塩酸を用いてpHを6.5~7.0に調整した。一方、50mgのBSAを1mlのPBSに溶解後、攪拌しながら上記溶液に滴下した。これに、2~5μlの25%グルタルアルデヒドPBS溶液を添加し、室温で90分間攪拌した。次に全溶液を4℃、24時間、PBSに対して透析した。これにより70mgのN-(4-アミノブチル)メタンフェタミン-ウシ血清アルブミン-グルタルアルデヒド複合体(MA-AB-BSA-GA)が得られた。または、25mgのKLHを1mlの蒸留水に溶解し、0.5mlのジメチルホルムアミドに溶かした15mgのN-(4-アミノブチル)メタンフェタミンを滴下し、攪拌した。これに1mlの蒸留水に溶かした500mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を添加し、室温で6時間攪拌した。全反応液を4℃、2日間、蒸留水に対して透析してEDCを除き、34mgのN-(4-アミノブチル)メタンフェタミン-陣笠貝ヘモシアニン(MA-AB-KLH-EDC)を得た。また、同様の操作で、KLHの代わりに卵白アルブミン(OVA)やBSAを用いてMA-AB-OVA-EDC、MA-AB-BSA-EDCをそれぞれ得た。更に、N-(4-アミノブチル)メタンフェタミンの代わりにN-カルボキシメチルメタンフェタミンとBSA、KLHを用いて、MA-CM-BSA-EDC、MA-CM-KLH-EDCをそれぞれ得た。

【0007】II. MAに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株の作製

#### (1) マウスへの抗原の投与と脾臓細胞の調整

I. で調製したメタンフェタミンと支持蛋白質との複合体を、4匹のマウスに投与した。例えば、0.1mgのMA-CM-KLH-GAを0.1mlのPBSに溶かし0.1mlのフロイントの完全アジュバンドとよく混合し、この乳化混合液0.2mlをBALB/c系、♀、7週齢のマウス腹腔内に投与した。投与後の各々のマウスから無菌的に脾臓を摘出し、RPMI1640組織培養用培地中で洗浄し、余分な脂肪組織を除いた。次に、新しいRPMI1640培地に移してハサミで細断後、ゴム栓を用いて脾臓内のリンパ細胞を押出した。浮遊しているリンパ細胞を遠心し(1,000rpm、5分間、室温)集め、RPMI1640培地で再懸濁し、次の細胞融合に用いた。この操作により、マウス-

8

匹から約 $1 \times 10^8$ 個のリンパ細胞が得られた。

#### (2) 細胞融合

約 $4 \times 10^7$ 個の対数増殖期にあるミエローマ細胞(653株)と(1)で得られた約 $1 \times 10^8$ 個リンパ細胞をRPMI1640培地中で混合し、遠心後(1,000rpm、5分間、室温)上清液を除いた。沈降したミエローマ細胞とリンパ細胞に、1mlの50%ポリエチレングリコール(Boehringer Mannheim社)-RPMI1640培地を1ml容ビベットを用いて、30秒間徐々に加えながら激しく振とうし混合した。次に、1mlのRPMI1640培地を1分間かけて添加しながら激しく振とうし、更に、8mlのRPMI1640培地を3分間かけて添加し、遠心後、上清液を除いた。30mlのHAT選択培地( $1 \times 10^{-4}$ Mヒポキサンチン、 $4 \times 10^{-7}$ Mアミノプテリン、 $1.6 \times 10^{-5}$ Mチミジン、20%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地)を添加し、細胞をよく懸濁した後、96ウェルの培養プレート3枚に分注した。すなわち、1ウェルあたり約 $4.7 \times 10^5$ 個の細胞を分注し、CO<sub>2</sub>インキュベータ(5%CO<sub>2</sub>、95%空気、37℃、湿度100%)を用いて培養した。

#### (3) ハイブリドーマの選択

各ウェルに細胞が増殖しているかどうかを、肉眼にて確認し、更に、このウェルの上清液中にメタンフェタミンを認識する抗体が存在しているかどうかを、次に示すELISA法を用いて検討した。各ウェルのELISA用プレート(ポリスチレン製、Immunolon Dynatech社)に、I. で調整した0.1mgのMA-AB-BSA-GAを10mlの50mM炭酸緩衝液(pH9.6)に溶解させ、各ウェルに0.1mlずつ分注し、4℃で一晩静置した。すなわち、1ウェルあたり1μgのMA-AB-BSA-GAが存在していることになり、この操作によりウェルの内壁に吸着する。次に、このプレートの各ウェルを洗浄用PBS(pH7.2、0.05%Tween20を含む)を用いて4回洗浄し、未吸着のMA-AB-BSA-GAを除いた。更に、各ウェルに0.5%BSAを含むPBSを0.1mlずつ分注し、37℃で1時間静置した。各ウェルを洗浄用PBSで4回洗浄し、細胞の増殖が確認されたウェルの上清液を0.1ml添加した。37℃、2時間静置した後、各ウェルを洗浄用PBSで4回洗浄し、マウス免疫グロブリンに対する抗体溶液(アルカリフォスファターゼ結合、Sigma社、0.5%BSAを含むPBSに1/500になるように希釈した)を0.1ml添加し、37℃、1時間静置した。各ウェルを洗浄用PBSで4回洗浄し、P-ニトロフェニルリン酸ナトリウム・6H<sub>2</sub>Oを1mg/mlに調整した基質溶液を0.1mlずつ添加後、室温で30分間静置した。陽性ウェルはアルカリフォスファターゼの酵素活性により、P-ニトロフェニルリン酸ナトリウムが分解され、黄色発色を

呈する。各ウェルに50 $\mu$ lの3MNaOHを添加して反応を停止し、マイクロプレート用吸光度測定器を用いて405nmの吸光度を測定した。次に、陽性ウェルの上清液を、MAを用いた競合阻害試験（先述の各ウェルの上清と共に、1 $\mu$ g/mlになるようにMAを添加した）を行った。これらのELISA法により、抗体を産生している51個の陽性ウェルが得られた。

#### (4) ハイブリドーマのクローニング

(3) で得られた51個の陽性ウェル中のハイブリドーマ細胞を、限界希釈法を用いてモノクローン化した。すなわち、ハイブリドーマ細胞を200個/ml、50個/ml、10個/mlとなるように20%FCSを含むRPMI1640培地で希釈し、各々の希釈液を96ウェルプレート上の3、45、48ウェルに0.1mlずつ分注した。このプレートをCO<sub>2</sub>インキュベータ中で培養し、一つのコロニーが一つのハイブリドーマ細胞由来であることが確認されるようなウェルを選択した。これらのウェルの上清液中に存在する抗体（モノクローナル抗体）がMAを認識するかどうかを、先述のELISA法により再検討した。この操作により、MAに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞が、24個得られた。

【0008】III. MAの類似化合物に対する抗MAモノクローナル抗体の選択性の検討およびMAとDBEDの両者に特異的免疫反応を示す請求項1のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株（請求項2の選別）24種のハイブリドーマ細胞の産生する抗MAモノクローナル抗体が、MAの構造類似化合物に対してどのような反応性を有するかについて、II. の(3)の工程で用いたELISA法により検討した。すなわち、各ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体を添加するときに、多段階に希釈した類似化合物を添加し、プレート上のMAとモノクローナル抗体の抗原抗体反応に対して、この類似化合物がどの程度、競合的に阻害反応を起すかを調べたものである。その結果、24種のハイブリドーマ株から得られるモノクローナル抗体のうちMAとDBEDのみに反応する4B2株または2H3株で表わされるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を選別した。表1にMAに対する反応性を100として、他の類似化合物に対する反応性について各々示した。

表中

MAは、メタンフェタミン

DBEDは、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン

Aは、アンフェタミン

MPAは、メトキシフェナミン

NOR-EP (+) は、ノルエフェドリン (+)

OH-MAは、P-ヒドロキシメタンフェタミン

OH-NOREPは、P-ヒドロキシノルエフェドリン

OH-EPは、P-ヒドロキシエフェドリン

10 OH-Aは、P-ヒドロキシアンフェタミン

MEは、メチルエフェドリン

NOR-EP (-) は、ノルエフェドリン (-)

EPは、エフェドリン

PHEは、フェンテルミン

MESは、メスカリン

である。

【表1】

| 化合物名       | モノクローナル抗体 |
|------------|-----------|
|            | 4B2       |
| MA         | 100%      |
| DBED       | 103.5     |
| A          | <1.1      |
| MPA        | <1.1      |
| NOR-EP (+) | <1.6      |
| OH-MA      | <1.1      |
| OH-NOREP   | <1.6      |
| OH-EP      | <1.6      |
| OH-A       | <1.1      |
| ME         | <1.4      |
| NOR-EP (-) | <1.6      |
| EP         | <1.1      |
| PHE        | <2.2      |
| MES        | <2.2      |

【表2】

| 化合物名       | モノクローナル抗体 |   |
|------------|-----------|---|
|            | 2H3       |   |
| MA         | 100       | % |
| DBED       | 212589    | % |
| A          | 2.4       | % |
| MPA        | <0.24     | % |
| NOR-EP (+) | <0.48     | % |
| OH-MA      | 3.7       | % |
| OH-NOREP   | <0.45     | % |
| OH-EP      | <0.45     | % |
| OH-A       | <0.24     | % |
| ME         | 1.8       | % |
| NOR-EP (-) | <0.3      | % |
| EP         | 1.5       | % |
| PHE        | <0.24     | % |
| MES        | <0.24     | % |

【0009】IV. マウス腹腔内での請求項2のハイブリドーマ細胞の培養と請求項1のモノクローナル抗体の精製

一週間前にプリスタン処理をしたマウス (BALB/c 系、♀、6週齢) に、II. で得られたハイブリドーマ細胞を腹腔内に  $1 \times 10^7$  個注入した。1-2週間後、ハイブリドーマ細胞の増殖とともに、マウス腹部の肥大化が確認され、シリンジを用いて腹腔中より腹水を採取した。この操作を1日おきに1-2週間程度行なうことにより、一匹のマウスから10-20mlの腹水が得られた。この腹水に飽和硫酸アンモニウム溶液を40%になるように添加し、IgGを含むタンパク質画分を沈澱させた。この沈澱物を遠心 (12,000rpm、4℃、20分間) により回収し、20mlのPBSに再懸濁した。懸濁液をPBSに対して一晩透析し、硫酸アンモニウムを除いた。この状態で、7-8mgのモノクローナル抗体が得られ、MAの判定、定量に十分使用できるが、更にDEAE-Sephadex陰イオン交換樹脂、G-150 Sephadexゲル濾過樹脂等を用いて精製することもできる。

【0010】V. ウレアーゼ標識モノクローナル抗体を用いたMAの測定法

(1) 酵素ウレアーゼのモノクローナル抗体への結合  
Avrameasらの方法 (Scand. J. Immunol. 8 Suppl. 7. 7. 1978) に準じ、グルタルアルデヒドを用いて、ウレアーゼとモノクローナル抗体を以下の方法で結合させた。得られたウレアーゼ標識モノクローナル抗体を更に、G-150 Sephadexゲル濾過カラム法により精製し、これ\*50

\*をMAとDBEDに対するモノクローナル抗体の標準抗体として用いた。すなわち、このモノクローナル抗体5mgとウレアーゼ2.5mg (酵素活性600-1, 200U/mg) を6mlのPBSに懸濁し、0.05%になるようにグルタルアルデヒドを添加した。室温で、3時間静置し、ウレアーゼ標識モノクローナル抗体とした。

(2) ELISA法を用いたMAの測定法

30 先述の現行の問題点で触れたように、測定法の中に覚醒剤であるMAを組み込むことは国内の麻薬取締法に抵触することから、MAの代わりにDBEDを使用する新規な方法を用いた。すなわち、DBEDにアミノブチル基 (AB) を導入し、これにBSAをグルタルアルデヒド (GA) を用いて結合させた (DBED-AB-BSA-GA)。得られたDBED-AB-BSA-GAをウェルあたり0.4μgになるように50mM炭酸緩衝液 (pH9.6) で調整し、96穴のELISA用プレート Immunolon (Dynatech社 商品名) に0.1mlずつ分注した。4℃、一晩静置した後、洗浄用PBS (pH7.2、0.05% Tween 20を含む) で3回洗浄し、次に、タンパク質の非特異的吸着を防ぐために、各ウェルに1%BSA、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS (pH7.2) を0.2mlずつ分注した。37℃で2時間静置した後、洗浄用PBSで3回洗浄した。VI. の(1)で調整した50μlのウレアーゼ標識モノクローナル抗体と、標準サンプルとして様々な濃度のMAに調整したPBS (0.5%BSA、0.05%アジ化ナトリウムを含む) を50μl混合し、計0.1mlの反応液を37℃、8分間静

13

置した。次に、洗浄用PBSで3回洗浄し、0.1mlの基質溶液(0.008%プロモクレゾールパープル、0.017M尿素、0.2mMEDTA、pH5.0)を添加した。仮に、サンプル中にMAがなければ、ウレアーゼ標識モノクローナル抗体はそのほとんどがウェル中のDBEDと反応しウェル中に残るため、尿素有分解しアンモニアが生成する。そのため、基質溶液中のpHを上昇させその変化をプロモクレゾールパープルの色の变化として確認することができる。一方、サンプル中にMAが存在する場合は、競合的に抗体と反応するため、ウェル中に残るウレアーゼ標識モノクローナル抗体が減少する。そのため、基質溶液の色の变化は確認できない。すなわち、プロモクレゾールパープルを用いた今回の実験系では、黄色の基質溶液が陰性の場合紫色に変化し、陽性の場合では黄色のまま変化しない。上記の発色反応は2分以内に終了し、10μlの1%チメロザールを添加することにより酵素反応を停止することができ、色の变化を肉眼観察か、もしくはマイクロプレート用の吸光度測定器を用いて570nmの吸光度を測定した。以上の操作により、すべての工程を11-13分間で行\*20

14

\*うことができ、また測定感度としては、肉眼観察では40ng/mlのMAを、吸光度測定器では6ng/mlのMAを判定することができた。

【0011】VI. MAの類似化合物に対するウレアーゼ標識モノクローナル抗体の選択性ハイブリドーマ細胞2H3株の産生する抗MAモノクローナル抗体のウレアーゼ標識物が、MAの類似化合物に対してどのような反応を有するかについて、II. の(3)の工程で用いたELISA法により検討した。すなわち、ウレアーゼ標識モノクローナル抗体(2H3)を添加するときに、多段階に希釈したMAの類似化合物を添加し、ウェル内のDBEDとの抗原抗体反応に対して、この類似化合物がどの程度、競合的に阻害反応を起こすかを調べたものである。結果については、表3に示した。この表では、MAに対する反応性を100として、他の類似化合物に対する反応性を示した。この結果、ウレアーゼ標識モノクローナル抗体(2H3)がMAとDBED以外の化合物に対して反応性が低く、MAの測定に極めて適していることがわかった。

【表3】

| 化合物名       | ウレアーゼ標識モノクローナル抗体(2H3株) |   |
|------------|------------------------|---|
|            | DBED-BSA (抗原複合体として)    |   |
| MA         | 100                    | % |
| DBED       | 4000                   | % |
| A          | 4.0                    | % |
| MPA        | 0.03                   | % |
| NOR-EP (+) | 0.37                   | % |
| OH-MA      | 3.72                   | % |
| OH-NOREP   | 0.05                   | % |
| OH-EP      | 0.42                   | % |
| OH-A       | 0.23                   | % |
| ME         | 2.61                   | % |
| NOR-EP (-) | 0.15                   | % |
| EP         | 2.65                   | % |
| PHE        | 0.22                   | % |
| MES        | <0.01                  | % |

#### 【0012】〔測定用キットとその用法〕

(I) 担体として容器を使用する場合について(図1→2)

容器内壁にDBED-支持蛋白質(この支持蛋白質については、MAの支持蛋白質についての説明と同じである)との複合体および支持蛋白質よりなる組成物を塗着させる。好ましくは、ポリスチレン製試験管に塗着させる。一方、本発明の酵素標識モノクローナル抗体液(例えばウレアーゼ標識モノクローナル抗体)を用意する。通常、モノクローナル抗体液は、0.1~2wt%の蛋※50

※白質、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、陣笠貝ヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン等の生体高分子、1~100μg/mlの濃度のモノクローナル抗体をリン酸、トリス緩衝液あるいは生理食塩水等に含有させたものである。この抗体液は冷蔵保存が望ましい。この液は腐敗することがあるので、例えば0.01~0.1%のアジ化ナトリウムやエチル水銀チオサルチル酸ナトリウム等の防腐剤を添加しておくことができる。測定用キットは、少なくとも、前記DBED支持体複合体を容器内壁に塗着した試験用容器と酵素標識モノクローナ



## 15

ル抗体液含有容器を含む。好ましい測定用キットとしては、

1. DBED-支持蛋白質複合体含有層で内壁が、コーティングされている試験管
2. 本発明の酵素標識モノクローナル抗体液含有容器
3. 基質溶液含有容器
4. 洗浄液含有洗浄びん
5. 定量用スポイト
6. 採尿用カップまたは唾液採取用容器

よりなる。覚醒剤使用容疑者から採取した尿または唾液（適当濃度に希釈してもよい）と酵素標識モノクローナル抗体液とを前記試験用容器に入れ、7～10分間反応させる（図1参照）。反応終了後、内容液を捨て洗浄液で充分洗浄して未反応の酵素標識モノクローナル抗体を除去する。ついで、アンモニウム検知用の溶液、例えばpH指示薬と尿素含有溶液を加えて反応させる。pH指示薬としてプロモクレゾールパープルを用いた場合には約1分後に陽性（MA含有）の場合は初めの黄色のまま変化せず、陰性の場合は紫色に変化する（図2参照）。なお、発色を固定したい場合には例えば1%チメロザール溶液を加えることができる。

【0013】II. 担体としてスティックを使用する場合スティックたとえばポリスチレン製スティックに、DBED-支持蛋白質複合体及び支持蛋白質よりなる組成物を塗着し、測定用スティックとする。一方、本発明の酵素標識モノクローナル抗体液を用意する。測定用キット\*

## 標 識 酵 素

- (A) 西洋ワサビペルオキシダーゼ
- (B) アルカリホスファターゼ
- (C)  $\beta$ -ガラクトシダーゼ
- (D) ウレアーゼ

前記浸漬処理約1分間で試験管内の溶液は陽性の場合は黄色のまま、陰性の場合は紫色に変化する（図4参照）。

【0014】III. 担体として吸引可能な容器を使用する場合について（図5→6）

## 16

\*は、少なくとも、前記測定用スティックと本発明の酵素標識モノクローナル抗体液を含有する容器を含む。好ましい測定用キットとしては

1. DBED-支持蛋白質複合体含有層をもつスティック
2. 本発明の酵素標識モノクローナル抗体含有容器
3. 基質溶液含有容器
4. 洗浄液含有容器
5. 洗浄用試験管
6. 定量用スポイト
7. 採尿用カップまたは唾液採取用容器

よりなる。覚醒剤使用容疑者から採取した尿または唾液（適当濃度に希釈してもよい）と酵素標識モノクローナル抗体液とを任意の試験用容器、たとえば、試験管に入れ、ここへ前記スティックを浸す。浸漬時間は7～10分間で充分反応する（図3～4参照）。反応終了後、洗浄液を含む試験管内に前記スティックを浸漬して洗浄する。この洗浄方法を1～4回繰返す。ついで、別途、基質溶液を試験管に入れ、この中に前記洗浄済みのスティックを浸漬処理する。前記基質溶液は水にその酵素に適した基質を加えたものである。標識に使用した酵素がウレアーゼの場合はプロモクレゾールパープルと尿素を含むpH5.0の溶液が使用できるが、これに限るものではない。目的にかなう試薬であれば、それを基質溶液として使用できることは勿論である。つぎに酵素と代表的な基質の組合せ例を示す。

## 基 質

- (イ) ジアミノベンジジン
- (ロ) O-フェニレンジアミン
- (ハ) 4-クロロ-1-ナフトール
- (ニ) 3-アミノ-9-エチルカルバゾール
- (ホ) 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン
- (ヘ) 2,2'-ジアミノ-ビス-(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)
- (ト) 5-アミノサルチル酸
- (イ) p-ニトロフェニルリン酸
- (ロ) 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸
- (ハ) ニトロブルー-テトラゾリウム
- (イ) 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -ガラクトシダーゼ
- (イ) 尿素

※図5、6に示すような吸引可能な容器内壁にDBED-支持蛋白質（この支持蛋白質については、MAの支持蛋白質についての説明と同じである）との複合体および支持蛋白質よりなる組成物を塗着させる。好ましくは、ポリスチレン製のピペット用容器の内壁に塗着させる。一

17

方、本発明の酵素標識モノクローナル抗体液（例えばウレアーゼ標識モノクローナル抗体）を用意する。この抗体液は冷蔵保存が望ましい。測定用キットは、少なくとも、前記DBED支持体複合体をその内壁に塗着したピペット用容器と酵素標識モノクローナル抗体液含有容器を含む。好ましい測定用キットとしては、

1. DBED-支持蛋白質複合体含有層で内壁が、コーティングされているピペット用容器
2. 本発明の酵素標識モノクローナル抗体液含有容器
3. 基質溶液含有容器
4. 洗浄液含有洗浄びん
5. 定量用スポイト
6. 採尿用カップまたは唾液採取用容器

よりなる。覚醒剤使用容疑者から採取した尿または唾液（適当濃度に希釈してもよい）と酵素標識モノクローナル抗体液とを前記ピペット用容器を注射器などに接続して吸引、注入し、7～10分間反応させる（図5参照）。反応終了後、内容液を捨て洗浄液で充分洗浄して未反応の酵素標識モノクローナル抗体を除去する。ついで、アンモニア検知用の溶液、例えばpH指示薬と尿素含有溶液を加えて反応させる。pH指示薬としてブロムクレゾールパープルを用いた場合には約1分後に陽性（MA含有）の場合は初めの黄色のまま変化せず、陰性

18

の場合は紫色に変化する（図6参照）。なお、発色を固定したい場合には例えば1%チメロザール溶液を加えることができる。

#### 【0015】

【効果】本発明の新規な酵素標識モノクローナル抗体の提供により、MA測定用キット中にMAを使用する必要がないので、国内でも使用が可能であり、しかも、簡単なキットにより短時間で適確にMAを検知することができる。

#### 10 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のMA測定用キットの1使用態様を示す図面であり、図1と図2により、その使用手順の全体を示すものである。

【図2】図1の使用手順のつづきを示す。

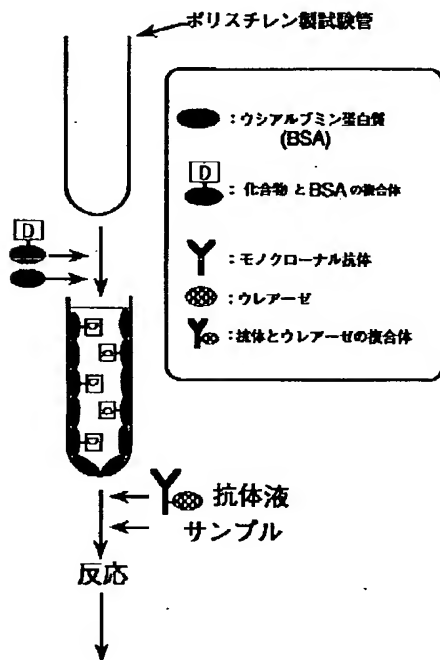
【図3】本発明のMA測定用キットの他の使用態様を示す図面であり、図3と図4により、その使用手順の全体を示すものである。

【図4】図3の使用手順のつづきを示す。

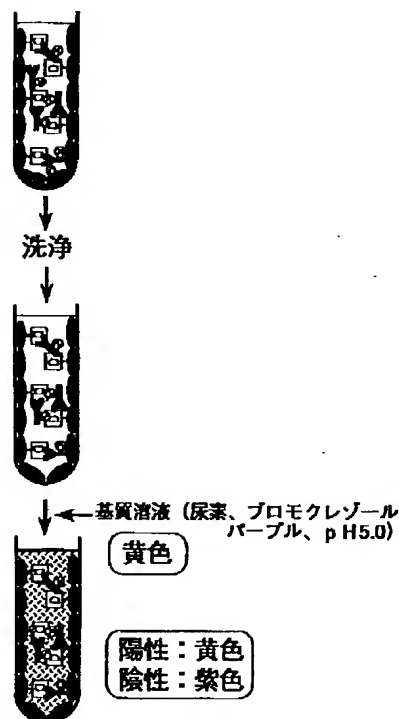
【図5】本発明のMA測定用キットのもう1つの使用態様を示す図面であり、図5と図6により、その使用手順の全体を示すものである。

【図6】図5の使用手順のつづきを示す。

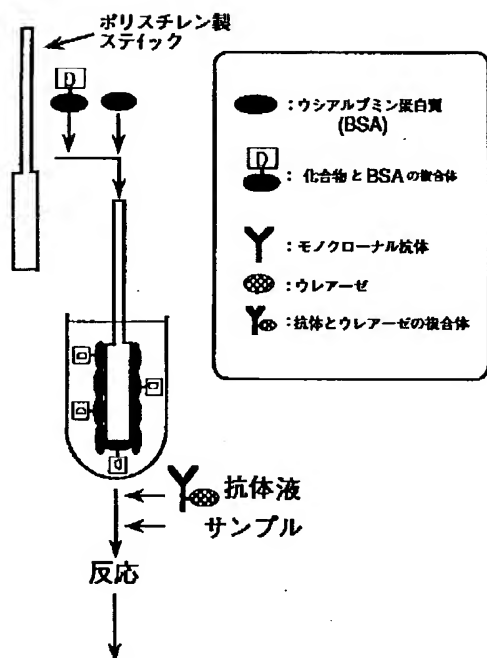
【図1】



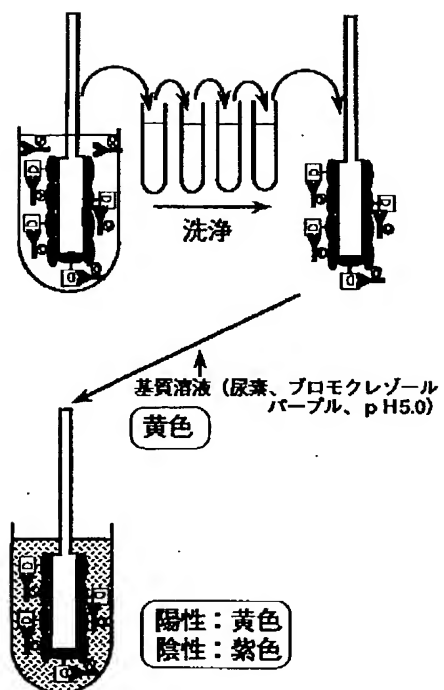
【図2】



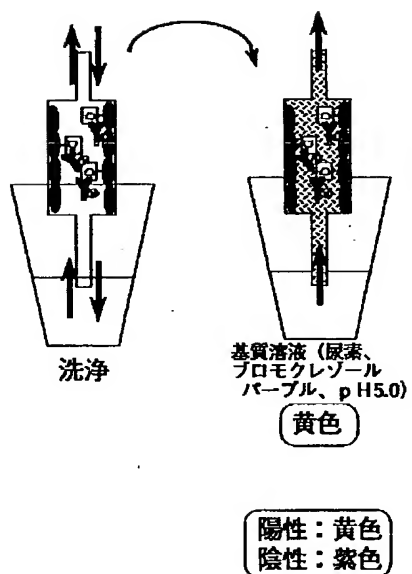
【図3】



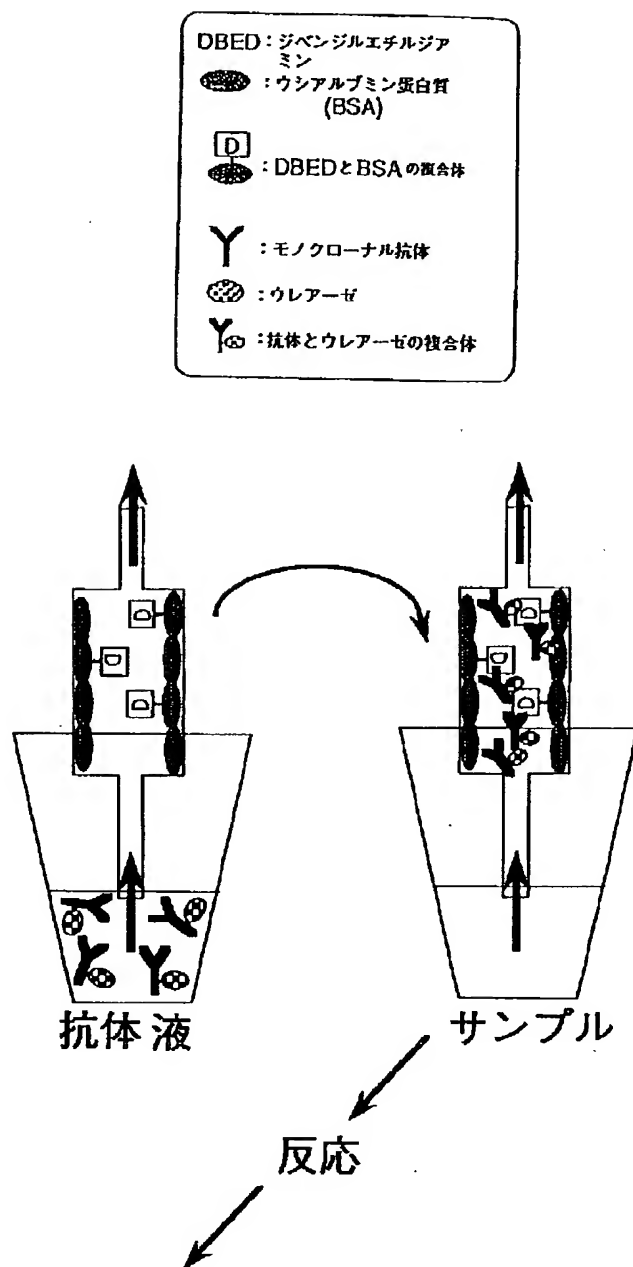
【図4】



【図6】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成3年7月29日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】V. ウレアーゼ標識モノクローナル抗体を

用いたMAの測定法

(1) 酵素ウレアーゼのモノクローナル抗体への結合  
 Avrameasらの方法(Scand. J. Immunol. 8 Suppl. 7. 7. 1978)に準じ、グルタルアルデヒドを用いて、ウレアーゼとモノクローナル抗体を以下の方法で結合させた。すなわち、このモノクローナル抗体5mgとウレアーゼ2.5mg

(酵素活性600-1, 200U/mg)を6mlのPBSに懸濁し、0.05%になるようにグルタルアルデヒドを添加した。室温で、3時間静置し、ウレアーゼ標識モノクローナル抗体とした。得られたウレアーゼ標識モノクローナル抗体を更に、G-150 Sephadexゲル濾過カラム法により精製し、これをMAとDBEDに対するモノクローナル抗体の標準抗体として用いた。

## (2) ELISA法を用いたMAの測定法

先述の現行の問題点で触れたように、測定法の中に覚醒剤であるMAを組み込むことは国内の麻薬取締り法に抵触することから、MAの代わりにDBEDを使用する新規な方法を用いた。すなわち、DBEDにアミノブチル基(AB)を導入し、これにBSAをグルタルアルデヒド(GA)を用いて結合させた(DBED-AB-BSA-GA)。得られたDBED-AB-BSA-GAをウェルあたり0.4μgになるように50mM炭酸緩衝液(pH9.6)で調整し、96穴のELISA用プレートImmunolon (Dynatech社 商品名)に0.1mlずつ分注した。4℃、一晩静置した後、洗浄用PBS(pH7.2, 0.05%Tween 20を含む)で3回洗浄し、次に、タンパク質の非特異的吸着を防ぐために、各ウェルに1%BSA、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS(pH7.2)を0.2mlずつ分注した。37℃で2時間静置した後、洗浄用PBSで3回洗浄した。V.の(1)で調整した50μlのウレアーゼ標識モノクローナル抗体と、標準サンプルとして様々な濃度のMAに調整したPBS(0.5%BSA、0.05%アジ化ナトリウムを含む)を50μl混合し、計0.1mlの反応液を37℃、8時間静置した。次に、洗浄用PBSで3回洗浄し、0.1mlの基質溶液(0.008%プロモクレゾールパープル、0.017M尿素、0.2mMEDTA、pH5.0)を添加した。仮に、サンプル中にMAがなければ、ウレアーゼ標識モノクローナル抗体はのほとんどがウェル中のDBEDと反応しウェル中に残るため、尿素有分解しアンモニアを生成する。そのため、基質溶液中のpHを上昇させその変化をプロモクレゾールパープルの色の变化として確認することができる。一方、サンプル中にMAが存在する場合は、競合的に抗体と反応するため、ウェル中に残るウレアーゼ標識モノクローナル抗体が減少する。そのため、基質溶液の色の变化は確認できない。すなわち、プロモクレゾールパープルを用いた今回の実験系では、黄色の基質溶液が陰性の場合紫色に変化し、陽性の場合では黄色のまま変化しない。上記の発色

### 標 識 酵 素

(A) 西洋ワサビペルオキシ  
ダーゼ

### 基 質

(イ) ジアミノベンジン  
(ロ) O-フェニレンジアミン  
(ハ) 4-クロロ-1-ナフトール  
(ニ) 3-アミノ-9-エチルカルバゾ

反応は2分以内に終了し、10μlの1%チメロザールを添加することにより酵素反応を停止することができ、色の变化を肉眼観察か、もしくはマイクロプレート用の吸光度測定器を用いて570nmの吸光度を測定した。以上の操作により、すべての工程を11-13分間で行うことができ、また測定感度としては、肉眼観察では40ng/mlのMAを、吸光度測定器では6ng/mlのMAを判定することができた。

### 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】II. 担体としてスティックを使用する場合スティックたとえばポリスチレン製スティックに、DBED-支持蛋白質複合体及び支持蛋白質よりなる組成物を塗着し、測定用スティックとする。一方、本発明の酵素標識モノクローナル抗体液を用意する。測定用キットは、少なくとも、前記測定用スティックと本発明の酵素標識モノクローナル抗体液を含有する容器を含む。好ましい測定用キットとしては

1. DBED-支持蛋白質複合体含有層をもつスティック
2. 本発明の酵素標識モノクローナル抗体含有容器
3. 基質溶液含有容器
4. 洗浄液含有容器
5. 洗浄用試験管
6. 定量用スポイト
7. 採尿用カップまたは唾液採取用容器

よりなる。覚醒剤使用容疑者から採取した尿または唾液(適当濃度に希釈してもよい)と酵素標識モノクローナル抗体液とを任意の試験用容器、たとえば、試験管にこれ、ここへ前記スティックを浸す。浸漬時間は7~10分間で充分反応する(図3~4参照)。反応終了後、洗浄液を含む試験管内に前記スティックを浸漬して洗浄する。この洗浄方法を1~4回繰返す。ついで、別途、基質溶液を試験管に入れ、この中に前記洗浄済みのスティックを浸漬処理する。前記基質溶液は水にその酵素に適した基質を加えたものである。標識に使用した酵素がウレアーゼの場合はプロモクレゾールパープルと尿素を含むpH5.0の溶液が使用できるが、これに限るものではない。目的にかなう試薬であれば、それを基質溶液として使用できることは勿論である。つぎに酵素と代表的な基質の組合せ例を示す。

ール

(ホ) 3,3',5,5'-テトラメチル  
ベンジジン(ヘ) 2,2-ジアミノ-ビス-(3-  
エチルベンズチアゾリン-6-ス  
ルホン酸)

(ト) 5-アミノサルチル酸

(B) アルカリホスファターゼ

(イ) p-ニトロフェニルリン酸

(ロ) 5-ブロモ-4-クロロ-3-イ  
ンドリルリン酸(C)  $\beta$ -ガラクトシダーゼ

(ハ) ニトロブルー-テトラゾリウム

(イ) 4-メチルウンベリフェリル-  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼ

(D) ウレアーゼ

(イ) 尿素

これら標識酵素と基質の組合せは、担体としてスティックを使用する場合に限らず、いずれの場合(I, II, III)にも適用できることは勿論である。前記浸漬処理約

1分間で試験管内の溶液は陽性の場合は黄色のまま、陰性の場合は紫色に変化する(図4参照)。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

片内整理番号

FI

技術表示箇所

G 0 1 N 33/543

P 7906-2J

33/577

B 9015-2J

// C 1 2 N 5/20

15/06

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

[Claim(s)]

[Claim 1] An enzyme labelled monoclonal antibody obtained by carrying out enzyme labeling of the monoclonal antibody which shows a specific immunoreaction to both of methamphetamine and N, and N'-dibenzyl ethylenediamine.

[Claim 2] (A) A kit for methamphetamine measurement characterized by containing an enzyme labelled monoclonal antibody according to claim 1 and support which made complex of (B) N and N'-dibenzyl ethylenediamine and support protein support.

[Claim 3] A kit for methamphetamine measurement according to claim 2 said whose support is a container or a stick.

[Claim 4] A kit for methamphetamine measurement according to claim 3 which is the container which said container can attract.

[Claim 5] (A) An enzyme labelled monoclonal antibody according to claim 1.

(B) A measuring method of methamphetamine in urine characterized by detecting an ammonia component which generated support (C) urine or a (saliva D) substrate solution which made complex of N and N'-dibenzyl ethylenediamine and support protein support after a mixed reaction, or saliva.

[Claim 6] Detection of said ammonia component is the measuring method of methamphetamine in urine according to claim 5 which is what is depended on pH change of a system, or saliva.

[Claim 7] Support which comes to fix complex of N and N'-dibenzyl ethylenediamine and support protein on it.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the kit for measurement and measuring method of the monoclonal antibody which carried out enzyme labeling of the monoclonal antibody recognized specifically, and the methamphetamine using it to both methamphetamine and N and N'-dibenzyl ethylenediamine.

[0002]

[Description of the Prior Art] the increment in the incident relevant to a psycho-stimulant -- following -- the user of methamphetamine (it may call for short Following MA) -- simplicity and the need of recognizing quickly and correctly -- rising -- simplicity, high sensitivity, and high -- the method and the kit for measurement which measure methamphetamine alternatively are desired. Obtaining the monoclonal antibody which shows specific, very high reactivity to the methamphetamine (MA) which is a psycho-stimulant is proposed by JP,1-96198,A by cultivating the cell strain obtained by carrying out immunity to an animal. And what is depended on the competing method based on the ELISA method is commercialized by the gaging system using the monoclonal antibody which recognizes only current and MA specifically. However, the actual condition is that need to use MA itself into a product by this gaging-system method, and, as for these products, manufacture, sale, and use are not accepted by the method of Japan of psycho-stimulant controlling.

[0003]

[Objects of the Invention] The purpose of this invention is in the point of offering the kit for MA measurement using offer and it and measuring method of the new enzyme labelled monoclonal antibody which recognizes the special material which is not against a law of Japan other than MA on a selection unique target, when guiding the monoclonal

antibody to MA.

[0004]

[Elements of the Invention] It is related with an enzyme labelled monoclonal antibody obtained by carrying out enzyme labeling of the monoclonal antibody which shows a specific immunoreaction to both the 1st methamphetamine and N of this invention, and N'-dibenzyl ethylenediamine. The 2nd of this invention is related with a kit for methamphetamine measurement characterized by containing support which made complex of (A) (B) N and N'-dibenzyl ethylenediamine and support protein support with an enzyme labelled monoclonal antibody according to claim 1. Although it is desirable that they are a container especially a container of structure which can be attracted, or a stick as for said support. Although a thing of forms of arbitration, such as the shape of the shape of a solid sphere and a cube and a needle, can be used besides it and there is no limit according to rank as the quality of the material, a thing with a property in which protein tends to adhere is suitable. Synthetic resin (for example, polystyrene, polyethylene, polypropylene, polymethylmethacrylate, a polyamide, polyester, etc.), rubber, glass, a nitrocellulose, etc. can be mentioned. The 3rd of this invention is related with a measuring method of methamphetamine in urine characterized by detecting an ammonia component which generated support (C) urine or (Saliva D) substrate solution which made complex of according to claim 1 enzyme labelled monoclonal antibody, (A) (B) N, and N'-dibenzyl ethylenediamine and support protein support after a mixed reaction, or saliva. Detection of said ammonia component has simplest method by pH change of a system, and can use a suitable pH indicator. It is related with support which fixed complex of the 4th N, N'-dibenzyl ethylenediamine, and support protein of this invention on it.

[0005] [A manufacture process of a monoclonal antibody]

A. adjustment methamphetamine (MA) of an antigen for immunity -- formation of amino butyl -- or it carboxymethyl-ized and formation of amino butyl or carboxymethyl-ized methamphetamine was built, support protein of arbitration was combined with this, complex was obtained, and this was made into an antigen for immunity. As said support protein, bovine serum albumin, ovalbumin, a military hat shellfish hemocyanin, thyroglobulin, gamma globulin, etc. can be mentioned. Moreover, as a cross linking agent which combines formation of amino butyl or carboxymethyl-ized methamphetamine, and support protein, glutaraldehyde, a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, dimethylformamide, maleimide benzoyloxy Succin inide, etc. are used.

B. Medicate mammals (for example, a mouse, a rat, etc.) with an antigen for the adjustment aforementioned immunity of a lymph cell 3 to 5 times every other week, and obtain a lymph cell from a hemolymph knot of the animal, a spleen, etc. after checking that an antibody to an antigen is generating enough. At this time, it is desirable to medicate an animal with it with antigen material as an immunostimulator, using an AJU band (MYUUBAN, tubercular killed bacteria, a nucleic acid, etc. being included) as an emulsion. A means to judge as a means to check generation of an antibody, from an animal which carried out immunity by using the ELISA method in a term of selection of a hybridoma of (II)-(3) which extracts venous blood and is mentioned later is raised.

C. As a myeloma cell used for cell fusion and selection cell fusion of a hybridoma stock For example, P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) of the mouse origin, SP2/0-Ag14 (SP-2), P3-NS1 / 1-Ag4.1 (NS-1), P3-X63-Ag8.653 (653), SKO-007 of P3-X63-Ag8 (X63), MPC-11, 210



3

of the rat origin, RCY3 and AG 1, 2, and 3 (Y3), and the Homo sapiens origin, GH15006 TG-A12, etc. can be mentioned. Cell fusion mixes a lymphocyte and a myeloma cell of an animal which were mentioned above and by which immunity was carried out so that it may be set to about 2-10:1. Although centrifugal separation of this can be carried out, a mixed sediment of a lymphocyte and a myeloma cell can be obtained, culture media for cell cultures (RPMI1640, MEM, DMEM, etc.) which contain a polyethylene glycol (PEG) or a Sendai virus (HVJ) in this can be added and it can carry out by suspending. It is desirable to use 30% - 60% of PEG (molecular weight 1000-8000) from a point on actuation. Selection of a hybridoma stock is re-suspended in a culture medium for cell cultures which carries out centrifugal [ of the cell suspension after fusion ], and contains hypoxanthine, aminopterin, thymidine (HAT), and 10% - 20% of fetal calf serum (FCS) in this except for supernatant liquid, and can be performed by pouring this suspension distributively on a plate for culture. A hybridoma cell chosen by this actuation is further cultivated by hypoxanthine, aminopterin (HT), and culture medium for cell cultures containing 10% - 20% of fetal calf serum (FCS), and it cultivates by culture medium for cell cultures which finally contains 10% - 20% of fetal calf serum (FCS). in order that an increased hybridoma cell may produce an antibody in culture-medium supernatant liquid in the meantime -- ELISA (enzyme immunoassay) -- law and RIA (radioisotope immunoassay) -- although existence of the target antibody can be investigated using law, a plaque measuring method, an agglutination reaction method, etc., it is desirable to use the ELISA method. As this ELISA method is the following, it can be performed. An antigen for immunity adjusted by A. is fixed in each well of an ELISA plate, and then biopolymer protein, such as bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA), a military hat shellfish hemocyanin (KLH), and an immunoglobulin, is fixed in each well as a blocking agent. This is for an antibody which a hybridoma cell produced to prevent sticking to a well nonspecific during the next actuation. After carrying out fixed time amount gentle placement, digestive liquor is thrown away and each well is washed by penetrant remover (mixed liquor of a phosphate buffer solution and a physiological saline solution and a surfactant may be included). Hybridoma cell culture digestive liquor is added to this, and fixed time amount gentle placement is carried out. Each well is similarly washed by penetrant remover, when an enzyme labelled antibody, for example, a mouse, is used next, what enzymes, such as alkaline phosphatase, and horseradish peroxidase, a beta galactosidase, combined with an anti-mouse IgG antibody is added to each well, and fixed time amount gentle placement is carried out. It adds and a substrate solution respectively corresponding to an enzyme which washed each well by penetrant remover, next was used is made to react. change of a color of a substrate produced by enzyme reaction when the target antibody existed in culture supernatant liquid -- a naked eye -- or it can check with a plate reader. Thus, a hybridoma cell which is producing an antibody can be obtained.

D. In a well checked by cloning C. of a hybridoma cell, since it may be the mixture of a hereditarily different hybridoma cell, it is necessary to obtain a hybridoma cell population which consists of a single gene by cloning actuation. this method -- limiting dilution and single SERUMANYU puree SHON -- law, a method of picking up every one colony on soft agar, and FACS -- although law (Fluorecent Activated Cell Sorter) is mentioned, it is desirable to use limiting dilution at a point not using special equipment. As this limiting dilution is the following, it can be performed. It adjusts by culture media for cell cultures

4

(RPMI1640, MEM, DMEM, etc.) which contain FCS 0 to 20% so that the above-mentioned hybridoma cell may be set to ml in 200 pieces [ ml ] /, 50 pieces [ ml ] /, and ten pieces /, and 0.1ml of each adjustment liquid is poured distributively to 3 on 96 well plate, 45, and each 48 wells. This plate is cultivated in a CO2 incubator and a well by which it is checked that one colony is the one hybridoma cell origin is chosen. It re-evaluates whether a monoclonal antibody which exists in digestive liquor of these wells recognizes MA by the ELISA method of C. Thus, a hybridoma cell population which consists of a single gene is obtained, and it can be said that an antibody produced from this cell is a monoclonal antibody.

E. It can carry out to adjustment of a monoclonal antibody to the adjustment MA of a monoclonal antibody by cultivating a hybridoma cell obtained by D. by the inside of a flask, or intraperitoneal. Culture within a flask of a hybridoma cell is performed using culture media for cell cultures containing 0 - 20% of FCS (RPMI1640, MEM, DMEM, etc.). If the maximum growth of the hybridoma cell is carried out and centrifugal separation is performed after that at this time, a secreted monoclonal antibody will be obtained in supernatant liquid. Intraperitoneal culture of a hybridoma cell is poured into intraperitoneal [ which prescribed straight mineral oil, such as pristane, for the patient for one to  $10 \times 10^6$  cells / of an animal ]. As for animal species used at this time, it is desirable to use a myeloma cell used as the origin, congener, and an affiliated animal so that it may be easy to increase a myeloma cell used for creation of a hybridoma cell. For example, when a mouse is used, growth of a hybridoma cell is accepted in intraperitoneal after one - two weeks by this actuation, and ascites is accumulated in intraperitoneal in connection with it. Since the target monoclonal antibody exists in belly underwater, from the abdominal cavity, it can collect ascites and can carry out separation purification of the monoclonal antibody by actuation of a salting-out, dialysis, ion exchange chromatography, an affinity chromatography, etc. further.

F. A monoclonal antibody and an enzyme of an enzyme labelled monoclonal antibody which carried out adjustment purification were processed in a buffer solution, and an enzyme labelled monoclonal antibody was obtained. As an enzyme, alkaline phosphatase, a horseradish, HERUOKISHIDAZE, an urease, beta-galactosidase, glucose oxidase, acetylcholineesterase, lactate dehydrogenase, the Glico amylase, a tyrosinase, etc. are mentioned.

G. Since synthetic resin, such as the joint method polystyrene by fixed (a) adsorption of DBED-support protein complex to a support top, polyethylene, polypropylene, polymethylmethacrylate, and styrene, adsorbs protein physically, said DBED-support protein complex and monoclonal antibody can be efficiently combined on the surface of support which makes these the quality of the material. Although support at this time is generally transparency and the frosted glass, it has some which have colored blue, yellow, purple, red, etc. However, the support which it is colored in that it excels in visibility is more desirable. Moreover, by using cross linking agents, such as an after [ reaction termination ] glutaraldehyde, a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, dimethylformamide, maleimide, and benzoyloxy Succin imide, although this reaction is ended in a room temperature and 1 - 10 hours, it can also adjust so that complex or a monoclonal antibody may not exfoliate from support, and so that more complex or monoclonal antibodies may stick to support.

(b) When that by which a carboxyl group and an amino group are given on the surface of

5

the joint method support by bridge formation is used, covalent bond of said DBED-support protein complex and monoclonal antibody can be carried out using said cross linking agent using these functional groups. Moreover, distance with support, complex, or a monoclonal antibody can also be changed to arbitration by inserting spacers, such as diamino butane, diamino hexan, and 5-aminocaproic acid, between support, complex, or a monoclonal antibody.

[0006]

[Example] Below, the example of this invention is explained concretely. In addition, these examples are for illustrating this invention, and do not limit the range of this invention.

In order to combine the adjustment methamphetamine (MA) of the adjustment 1. amino butyl-ized methamphetamine of the antigen for example 11. immunity with suitable protein, the amino group was introduced into MA according to Cheng's and others method [FEBS LETTERS 36,339 (1973)]. 400mg methamphetamine (MA) was dissolved in the 40ml ethanol which dehydrated, 2.272g N-(4-BUROMO butyl) phthalimide and the 852mg sodium carbonate were added, and it flowed back for four days. Next, the water hydrazine was added 85 0.5ml%, and it agitated for two days. After adding the 1-N hydrochloric acid to reaction mixture and making it acidity, the produced precipitate was removed by filtration. Filtrate was extracted 3 times using 50ml chloroform, and the water layer was further extracted 4 times after adjusting pH to 10 using 50ml chloroform using the 1-N sodium hydroxide. In accordance with the chloroform layer, it dehydrated with magnesium sulfate and reduced pressure distilling off of the chloroform was carried out. Thus, 1.27g N-(4-amino butyl) methamphetamine was obtained.

[Formula 1]

2. In order to combine the adjustment MA of carboxymethyl-ized methamphetamine with suitable protein, the carboxyl group was introduced into MA according to Inayama's and others method [Chem.Pharm.Bull 28 and 2779 (1980)]. All the following reactions were performed at the room temperature. 600mg methamphetamine, a 852mg sodium carbonate, and 1.5ml ethyl bromoacetic acid were dissolved into 40ml ethanol, and it flowed back for five days under nitrogen gas charging. Except for precipitate, vacuum concentration of the filtrate was carried out after reaction termination by filtration. Next, 5% of 30ml potassium-hydroxide-methanol solution was added, and it agitated for two days under nitrogen gas charging. Reaction mixture was made into acidity with the 2-N hydrochloric acid after reaction termination, and vacuum concentration was carried out even to about 1ml. The 5ml saturation sodium chloride aqueous solution was added to this, and 25ml chloroform extracted 5 times. Vacuum concentration of this chloroform layer was dehydrated and carried out with magnesium sulfate. Thus, 691.1mg N-carboxymethyl methamphetamine was obtained.

[Formula 2]

3. Adjustment of the antigen used for the antigen for immunity or enzyme immunoassay

(Following ELISA and abbreviation) was performed using the above-mentioned formation of amino butyl, or carboxymethyl-ized methamphetamine. pH was adjusted to 6.5-7.0 using the 1-N hydrochloric acid after dissolving 25mg N-(4-amino butyl) methamphetamine in 1ml PBS (a 10mM-phosphate buffer solution, a 150mM-sodium chloride, pH7.2). On the other hand, it was dropped at the above-mentioned solution after dissolving 50mg BSA in 1ml PBS, agitating. To this, the 25% guru tar ARUDEBITO PBS solution of 2-5microl was added, and it agitated for 90 minutes at the room temperature to it. Next, all solutions were dialyzed to PBS for 4 degrees C and 24 hours. Thereby, 70mg N-(4-amino butyl) methamphetamine-bovine-serum-albumin-glutaraldehyde complex (MA-AB-BSA-GA) was obtained. Or 25mg KLH was dissolved in 1ml distilled water, and 15mg N-(4-amino butyl) methamphetamine melted to 0.5ml dimethylformamide was dropped and agitated. The 500mg 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) melted to 1ml distilled water at this was added, and it agitated at the room temperature for 6 hours. Overall reaction liquid was dialyzed to 4 degrees C, two days, and distilled water, and the 34mg N-(4-amino butyl) methamphetamine-military hat shellfish hemocyanin (MA-AB-KLH-EDC) was obtained except for EDC. Moreover, by the same actuation, ovalbumin (OVA) and BSA were used instead of KLH, and MA-AB-OVA-EDC and MA-AB-BSA-EDC were obtained, respectively. Furthermore, N-carboxymethyl methamphetamine, BSA, and KLH were used instead of N-(4-amino butyl) methamphetamine, and MA-CM-BSA-EDC and MA-CM-KLH-EDC were obtained, respectively.

[0007] Four mice were medicated with the complex of administration of the antigen to the production (1) mouse of the hybridoma stock which produces the monoclonal antibody to II.MA, the methamphetamine prepared by adjustment I. of a spleen cell, and support protein. For example, 0.1mg MA-CM-KLH-GA was melted to 0.1ml PBS, and it often mixed with the 0.1ml perfect AJU band of Freund, and medicated a BALB/c system, \*\*, and 7-weeks old mouse intraperitoneal with 0.2ml of this emulsification mixed liquor. The spleen was extracted in sterile from each mouse after administration, it washed in the culture medium for RPMI1640 tissue culture, and excessive fat tissue was removed. Next, it moved to RPMI1640 new culture medium, and the lymph cell in a spleen was pushed out after beating using the rubber stopper with scissors. Centrifugal [ of the lymph cell which is floating ] was carried out (for 1,000rpm and 5 minutes, room temperature), they were collected, and it re-suspended in RPMI1640 culture medium, and used for the next cell fusion. By this actuation, about  $1 \times 10^8$  lymph cells were obtained from one mouse.

(2) The myeloma cell (653 shares) in the logarithmic growth phase of about  $4 \times 10^7$  cell fusion and the about  $1 \times 10^8$ -piece lymph cell obtained by (1) were mixed in the RPMI1640 culture medium, and digestive liquor was removed after centrifugal (for 1,000rpm and 5 minutes, room temperature). Having used 1ml \*\* pipet for the myeloma cell and lymph cell which sedimented, and adding gradually 50% polyethylene-glycol (BoehringerMannheim)-RPMI1640 1ml culture medium to them for 30 seconds, it shook violently and mixed. Next, it shook violently, adding having applied RPMI1640 1ml culture medium for 1 minute, and further, it added having applied RPMI1640 8ml culture medium for 3 minutes, and digestive liquor was removed after centrifugal. After adding the 30ml HAT selective medium ( $1 \times 10^{-4}$ M hypoxanthine,  $4 \times 10^{-7}$ M aminopterin,  $1.6 \times 10^{-5}$ M thymidine, RPMI1640 culture medium that contains fetal calf serum 20%) and

suspending a cell well, it poured distributively on three culture plates of 96 wells. That is, about  $4.7 \times 10^5$  cells per one well were poured distributively, and it cultivated using the CO<sub>2</sub> incubator (5%CO<sub>2</sub>, 95% air, 37 degrees C, 100% of humidity).

(3) It checked whether the cell would increase to selection each well of a hybridoma with the naked eye, and examined whether the antibody which recognizes methamphetamine in the digestive liquor of this well would exist further using the ELISA method shown below. 10ml 50mM carbonic acid buffer solution (pH9.6) was made to dissolve 0.1mg MA-AB-BSA-GA adjusted by I. in the plate for ELISA of each well (the product made from polystyrene, and Immunolon Dynatech), 0.1ml was poured distributively to each well of each, and it put at 4 degrees C overnight. That is, MA-AB-BSA-GA of 1micropere one well g will exist, and it sticks to the wall of a well by this actuation. Next, each well of this plate was washed 4 times using PBS for washing (pH7.2 and 0.05%Tween20 are included), and non-adsorbed MA-AB-BSA-GA was removed. Furthermore, it poured distributively at a time 0.1ml of PBS which contains BSA in each well 0.5%, and put at 37 degrees C for 1 hour. Each well was washed 4 times by PBS for washing, and 0.1ml of digestive liquor of a well with which growth of a cell was checked was added. After putting for 2 hours, each well was washed 4 times by PBS for washing, 0.1ml added and 37 degrees C (it diluted so that it might be set to alkaline phosphatase association, Sigma, and PBS that contains BSA 0.5% to 1/500) of 37 degrees C of antibody solutions to a mouse immunoglobulin were put for 1 hour. Each well was washed 4 times by PBS for washing, and it put at a time after addition 0.1ml of substrate solutions which adjusted [ ml ] P-nitrophenyl sodium phosphate and 6H<sub>2</sub>O in 1mg /for 30 minutes at the room temperature. P-nitrophenyl sodium phosphate is disassembled by the enzyme activity of alkaline phosphatase, and a positive well presents yellow coloring. 3MNaOH(s) of 50microl were added to each well, the reaction was suspended, and the absorbance of 405nm was measured using the absorbance measuring instrument for microplates. Next, the competitive inhibition [ digestive liquor / of a positive well ] trial (MA was added so that it might become [ ml ] in 1microg /with the supernatant liquid of each well of point \*\*) using MA was performed. 51 positive wells which are producing the antibody were obtained by these ELISA methods.

(4) The hybridoma cell in 51 positive wells obtained by cloning (3) of a hybridoma was monoclonal-ized using limiting dilution. That is, it diluted with RPMI1640 culture medium which contains FCS 20% so that a hybridoma cell might be set to ml in 200 pieces [ ml ] /, 50 pieces [ ml ] /, and ten pieces /, and 0.1ml of each diluents was poured distributively to 3 on 96 well plate, 45, and each 48 wells. This plate was cultivated in the CO<sub>2</sub> incubator and a well by which it is checked that one colony is the one hybridoma cell origin was chosen. The antibody (monoclonal antibody) which exists in the digestive liquor of these wells re-evaluated whether MA would be recognized or not by the ELISA method of point \*\*. 24 hybridoma cells which produce the monoclonal antibody to MA by this actuation were obtained.

[0008] Anti-MA monoclonal antibody which the hybridoma cell of 24 sorts of hybridoma stocks (sorting of claim 2) which produce the monoclonal antibody of claim 1 which shows a specific immunoreaction to both the examination and MA of the selectivity of anti-MA monoclonal antibody to the analogue of III.MA, and DBED produces examined what kind of reactivity it would have to the structure analogue of MA by the ELISA method used at the production process of (3) of II. That is, when adding the monoclonal

8

antibody which each hybridoma produces, the analogue diluted on the multistage story is added and it investigates how much this analogue causes an inhibition reaction competitively to MA on a plate, and the antigen-antibody reaction of a monoclonal antibody. Consequently, the hybridoma stock which produces the monoclonal antibody expressed with 4 B-2 stocks which react only to MA and DBED among the monoclonal antibodies obtained from 24 sorts of hybridoma stocks, or 2H3 share was sorted out. The reactivity over other analogue was respectively shown in a table 1, having used reactivity over MA as 100.

For Amphetamine MPA, methoxyphenamine NOR-EP (+) is [ the inside MA of a table / Methamphetamine DBED / N and N'-dibenzyl ethylenediamine A ] norephedrine (+).

For the P-hydroxyamphetamine ME, methylephedrine NOR-EP (-) is [ OH-MA / P-hydroxy methamphetamine OH-NOREP / P-hydroxy norephedrine OH-EP / P-hydroxyephedrine OH-A ] norephedrine (-).

EP is [ Phentermine MES of Ephedrine PHE ] mescaline.

[A table 1]

[A table 2]

[0009] The hybridoma cell obtained by II. was poured into the mouse (a BALB/c system, \*\*, 6 weeks old) which carried out pristane processing before culture of the hybridoma cell of IV. mouse intraperitoneal claim 2, and one week of purification of the monoclonal antibody of claim 1 intraperitoneal [  $1 \times 10^7$  ]. After one to two weeks, with growth of a hybridoma cell, hypertrophy of a mouse abdomen was checked and ascites was extracted from the inside of the abdominal cavity using the syringe. By performing this actuation about one to two weeks every other day, the ascites of ten to 20 ml was obtained from one mouse. It added so that it might become 40% to this ascites about a saturation ammonium-sulfate solution, and the protein fraction containing IgG was settled. Centrifugal (for 12,000rpm, 4 degrees C, and 20 minutes) recovered these settlings, and it re-suspended in 20ml PBS. Suspension was dialyzed to PBS overnight and the ammonium sulfate was removed. Although the monoclonal antibody of seven to 8 mg is obtained and it can be enough used for the judgment of MA, and a quantum in this condition, it is DEAE-Sepharose anion exchange resin and G-150 further. It can also refine using Sephadex gel filtration resin etc.

[0010] V. According to the method (Scand.J.Immunol.8 Suppl. 7.7. 1978) of the association Avrameas to the monoclonal antibody of the measuring method (1) enzyme urease of MA using an urease labelled monoclonal antibody, the urease and the monoclonal antibody were combined by the following methods using the glutaraldehyde. It is the obtained urease labelled monoclonal antibody further G-150 It refined with the Sephadex gel filtration column method, and this was used as a standard antibody of the monoclonal antibody to MA and DBED. That is, 5mg of this monoclonal antibody and urease 2.5mg (enzyme activity 600-1,200U/mg) were suspended in 6ml PBS, and the

10

glutaraldehyde was added so that it might become 0.05%. At the room temperature, it put for 3 hours and considered as the urease labelled monoclonal antibody.

(2) As the present trouble of measuring method point \*\* of MA using the ELISA method described, since it was against the domestic narcotics controlling method, incorporating MA which is a psycho-stimulant into a measuring method used the new method of using DBED instead of MA. That is, amino butyl (AB) is introduced into DBED, the glutaraldehyde (GA) was used for this and BSA was combined with it (DBED-AB-BSA-GA). 50mM carbonic acid buffer solution (pH9.6) adjusts obtained DBED-AB-BSA-GA so that it may be set to 0.4microper well g, and it is the plate Immunolon for ELISA of 96 holes. (Dynatech trade name) It poured 0.1ml distributively at a time. After putting 4 degrees C and overnight, in order [ each ] to wash 3 times by PBS for washing (pH7.2 and 0.05%Tween20 are included), next to prevent proteinic nonspecific adsorption, 0.2ml (pH7.2) of PBS which contains BSA and 0.05% sodium azide in each well 1% was poured distributively. After putting at 37 degrees C for 2 hours, it washed 3 times by PBS for washing. 50microl mixing of PBS (BSA and 0.05% sodium azide are included 0.5%) adjusted to the urease labelled monoclonal antibody of 50microl adjusted by (1) of VI. and MA of various concentration as a correlation sample was done, and a total of 37 degrees C of 0.1ml reaction mixture was put for 8 minutes. Next, it washed 3 times by PBS for washing, and the 0.1ml substrate solution (0.008% bromocresol purple, 0.017M urea, 0.2mMEDTA, pH5.0) was added. Temporarily, if there is no MA into a sample, in order that the most may react with DBED in a well and may remain into a well, an urease labelled monoclonal antibody will disassemble a urea and ammonia will generate it. Therefore, pH in a substrate solution is raised and the change can be checked as change of the color of bromocresol purple. On the other hand, when MA exists in a sample, in order to react with an antibody competitively, the urease labelled monoclonal antibody which remains into a well decreases. Therefore, change of the color of a substrate solution cannot be checked. That is, by this experiment system using bromocresol purple, when a yellow substrate solution is negative, it changes to purple, and in a positive case, it does not change with yellow. ending the above-mentioned coloring reaction within 2 minutes, and adding 1% CHIMEROZARU of 10microl -- an enzyme reaction -- it can stop -- change of a color -- macro-scopic observation -- or the absorbance of 570nm was measured using the absorbance measuring instrument for microplates. By the above actuation, all the production processes could be performed in 11 to 13 minutes, and as sensitometry, 40 ng(s)/ml MA was able to be judged in macro-scopic observation, and 6 ng(s)/ml MA was able to be judged with the absorbance measuring instrument.

[0011] The urease indicator object of selectivity hybridoma cell 2H3 share anti-MA monoclonal antibody of the urease labelled monoclonal antibody to the analogue of VI.MA to produce examined what kind of reaction it would have to the analogue of MA by the ELISA method used at the production process of (3) of II. That is, when adding an urease labelled monoclonal antibody (2H3), the analogue of MA diluted on the multistage story is added, and it investigates how much this analogue causes an inhibition reaction competitively to an antigen-antibody reaction with DBED in a well. The result was shown in a table 3. The reactivity over other analogue was shown with this table, having used reactivity over MA as 100. Consequently, the urease labelled monoclonal antibody (2H3) of reactivity was low to compounds other than MA and DBED, and it turned out that it is extremely suitable for measurement of MA.



[0012] [The kit for measurement, and its usage]

(I) When a container is used as support ( drawing 1 -> 2)

A container wall is made to plaster with the constituent which consists of complex and support protein with DBED-support protein (it is the same as the explanation about the support protein of MA about this support protein). The test tube made from polystyrene is made to plaster preferably. On the other hand, the enzyme labelled monoclonal antibody liquid (for example, urease labelled monoclonal antibody) of this invention is prepared. Usually, monoclonal antibody liquid makes a phosphoric acid, tris buffers, or a physiological saline contain the monoclonal antibody of biopolymers, such as 0.1 - 2wt% protein (BSA), for example, bovine serum albumin, a military hat shellfish hemocyanin (KLH), and ovalbumin, and 1-100microg [/ml ] concentration. This antibody liquid has desirable refrigeration conservation. Since this liquid may be decomposed, antiseptics, such as 0.01 - 0.1% of sodium azide and ethyl mercury thio salicylic acid sodium, can be added, for example. The kit for measurement contains at least the container for a trial and enzyme labelled monoclonal antibody liquid content container which plastered the container wall with said DBED base material complex. the enzyme labelled monoclonal antibody liquid content container 3. substrate solution content container 4. penetrant remover of test tube 2. this invention to which coating of the wall is carried out in the 1.DBED-support protein complex content layer as a desirable kit for measurement -- it consists of a cup for syringe 6. urine test for content wash-bottle 5. quanta, or a container for saliva extraction. The urine or saliva (you may dilute to suitable concentration) extracted from the psycho-stimulant use suspect, and enzyme labelled monoclonal antibody liquid are put into said container for a trial, and are made to react for 7 - 10

minutes (refer to drawing 1 ). After reaction termination, contents liquid is thrown away, it washes enough by the penetrant remover, and an unreacted enzyme labelled monoclonal antibody is removed. Subsequently, the solution for ammonia detection, for example, a pH indicator and a urea content solution, is added, and they are made to react. When bromocresol purple is used as a pH indicator, after about 1 minute, in a positive (MA content) case, it does not change with the first yellow, but, in a negative case, changes purple (refer to drawing 2 ). In addition, for example, a CHIMEROZARU solution can be added 1% to fix coloring.

[0013] When using a stick as II. support, a stick, for example, the stick made from polystyrene, is plastered with the constituent which consists of DBED-support protein complex and support protein, and it considers as the stick for measurement. On the other hand, the enzyme labelled monoclonal antibody liquid of this invention is prepared. The kit for measurement contains said stick for measurement, and the container containing the enzyme labelled monoclonal antibody liquid of this invention at least. enzyme labelled monoclonal antibody content container 3. substrate solution content container 4. penetrant remover content container 5. washing of stick 2. this invention which has a 1.DBED-support protein complex content layer as a desirable kit for measurement -- it consists of \*\* a cup for syringe 7. urine test or for test tube 6. quanta, and a container for saliva extraction. The urine or saliva (you may dilute to suitable concentration) extracted from the psycho-stimulant use suspect, and enzyme labelled monoclonal antibody liquid are put into the container for a trial of arbitration, for example, a test tube, and said stick is dipped here. Immersion time amount reacts enough in 7 - 10 minutes ( drawing 3 - 4 reference). After reaction termination, in the test tube containing a penetrant remover, it is immersed and said stick is washed. This washing method is repeated 1 to 4 times. Subsequently, separately, a substrate solution is put into a test tube and immersion processing of the stick [ finishing / said washing in this ] is carried out. Said substrate solution adds the substrate suitable for the enzyme to water. Although the solution of pH5.0 containing bromocresol purple and a urea can be used when the enzyme used for the indicator is an urease, it does not restrict to this. If it is the reagent which suits the purpose, of course, it can be used as a substrate solution. The example of combination of a typical substrate is indicated to be an enzyme below.

Label \*\* \*\* Base Radical (Nature A) horseradish peroxy (b) diaminobenzidine DAZE A (b) O-phenylenediamine A 4-chloro-1-naphthol (Ha) (d) 3-amino-9-ethyl KARUBAZO - RU (\*\*) -- 3, 3', 5, and 5'-tetramethyl benzidine (\*\*) -- 2 and 2-diamino-screw - (3-ethyl bends thiazoline-6-SU RUHON acid)

(\*\*) -- 5-amino salicylic acid (B) alkaline phosphatase A (b) P-nitrophenyl phosphoric acid (b) 5-BUROMO-4-chloro-3-I A NDORIRURIN acid The nitroblue tetrazolium (C) beta-galactosidase (Ha) (b) 4-methyl umbelliferryl - Beta-galactosidase (D) urease (\*\*) -- in a positivity [ solution / in a test tube ], in a negative case, it changes purple in [ urea aforementioned immersion processing ] about 1 minute with yellow (refer to drawing 4 ).

[0014] When the container which can be attracted as III. support is used ( drawing 5 -> 6) Drawing 5 and the container wall which can be attracted as shown in 6 are made to plaster with the constituent which consists of complex and support protein with DBED-support protein (it is the same as the explanation about the support protein of MA about this support protein). The wall of the container for pipets made from polystyrene is made to plaster preferably. On the other hand, the enzyme labelled monoclonal antibody liquid

(for example, urease labelled monoclonal antibody) of this invention is prepared. This antibody liquid has desirable refrigeration conservation. The kit for measurement contains at least the container for pipets and enzyme labelled monoclonal antibody liquid content container which plastered the wall with said DBED base material complex. the enzyme labelled monoclonal antibody liquid content container 3. substrate solution content container 4. penetrant remover of container 2. this invention for pipets to which coating of the wall is carried out in the 1.DBED-support protein complex content layer as a desirable kit for measurement -- it consists of a cup for syringe 6. urine test for content wash-bottle 5. quanta, or a container for saliva extraction. Said container for pipets is connected to a syringe etc., and the urine or saliva (you may dilute to suitable concentration) extracted from the psycho-stimulant use suspect, and enzyme labelled monoclonal antibody liquid are attracted and poured in, and are made to react for 7 - 10 minutes (refer to drawing 5 ). After reaction termination, contents liquid is thrown away, it washes enough by the penetrant remover, and an unreacted enzyme labelled monoclonal antibody is removed. Subsequently, the solution for ammonia detection, for example, a pH indicator and a urea content solution, is added, and they are made to react. When bromocresol purple is used as a pH indicator, after about 1 minute, in a positive (MA content) case, it does not change with the first yellow, but, in a negative case, changes purple (refer to drawing 6 ). In addition, for example, a CHIMEROZARU solution can be added 1% to fix coloring.

[0015]

[Effect] By offer of the new enzyme labelled monoclonal antibody of this invention, since it is not necessary to use MA into the kit for MA measurement, it can be used also at home, and moreover, MA can be accurately detected with an easy kit in a short time.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the drawing in which 1 use mode of the kit for MA measurement of this invention is shown, and drawing 1 and drawing 2 show the whole procedure used.

[Drawing 2] A continuation of the procedure used of drawing 1 is shown.

[Drawing 3] It is the drawing in which other use modes of the kit for MA measurement of this invention are shown, and drawing 3 and drawing 4 show the whole procedure used.

[Drawing 4] A continuation of the procedure used of drawing 3 is shown.

[Drawing 5] It is the drawing in which another use mode of the kit for MA measurement of this invention is shown, and drawing 5 and drawing 6 show the whole procedure used.

[Drawing 6] A continuation of the procedure used of drawing 5 is shown.